

空気清浄機のフィルターに捕捉した ウイルスに対する抑制性能評価試験方法

2011 年（平成 23 年）7 月 4 日制定



一般社団法人日本電機工業会

空気清浄機のフィルターに捕捉した ウイルスに対する抑制性能評価試験方法

1. 目的

空気清浄機のフィルターに捕捉したウイルスに対する抑制の評価方法を定める。

2. 対象品目

空気清浄機を対象とする。但し、その他の品目にも準用することを妨げない。

3. 試験機関

試験は公的機関に依頼する。

- 公的機関の例
1. (財) 北里環境科学センター
 2. (財) 日本食品分析センター

4. 試験微生物等

試験に用いる微生物は下記から選択する。下記では例として大腸菌ファージおよびインフルエンザウイルスを用いる例を挙げる。これ以外に適切なものがあれば追加する。なお、WHO ガイドライン及び「国立感染症研究所病原体等安全管理規程」においてBSL2（バイオセフティーレベル2；Biosafety Level 2）以上に区分されている微生物（インフルエンザウイルス等）の使用にあたっては、病原体等の管理と使用に関する現行の法律および指針の順守が必要である。

1) 大腸菌ファージと宿主菌：（下記のいずれかを選択）

- ① 大腸菌ファージ *Escherichia coli* phage Phi-X174 (ATCC 13706-B1、NBRC 103405 等)、宿主菌 *Escherichia coli* (ATCC 13706、NBRC 13898 等)
- ② 大腸菌ファージ *Escherichia coli* phage MS2 (NBRC 102619 等)、宿主菌 *Escherichia coli* (NBRC 3012、同 13965、同 106373 等)

2) インフルエンザウイルス A 型と宿主細胞：（下記は代表例）

- ① *Influenza A virus* H1N1(A/PR/8/34) ATCC VR-95 等
- ② *Influenza A virus* H3N2(A/Aichi/2/68) ATCC VR-547 等

宿主細胞は、発育鶏卵または使用するウイルス株に感受性がある培養細胞（Madin-Darby canine kidney；MDCK 細胞等）とする。

ファージの種類選択にあたっては、評価目的としたヒトウイルスと代替使用するファージが各メーカーの機器に対して示す感受性をあらかじめ調べておく。その結果、ファージの感受性がヒトウイルスと同等ないし低いファージ種を用いることとする。

5. 試験方法

対象フィルターは、浮遊ウイルスまたは飛まつ物を、70%以上抑制または捕捉できるフィルターであることを確認すること。風速は任意とするが、試験品の風量切替ボタンで設定できない風量では試験してはならない。

捕捉したウイルスへの抑制性能確認試験は下記1)、2)いずれかの試験方法を選択する。

- 1) 20～32m³ の試験チャンバー内に対象フィルターを搭載した試験品（空気清浄機）を設

置し、チャンバー内にファージ懸濁液を噴霧、浮遊させる。初発（0 時間）の浮遊ファージをインピンジャーもしくはゼラチンフィルターで捕集後、試験品の運転を開始する。なお、詳細の試験方法は「空気清浄機の浮遊ウイルスに対する除去性能評価試験方法」に準ずる。

試験終了後、試験品から対象フィルターを取り出し、一定面積（10×10cm）を切り出して試験片とする。試験片をストマッカー袋に入れ、0.015%チオ硫酸ナトリウム溶液 20ml を加えてストマッカー処理したものを試料原液とし、イオン交換水で 10 倍段階希釈液を作製する。その試料原液または希釈液と大腸菌を半流動寒天に混合し、35℃で 18 時間培養する。培養後、培地上に発生したプラーク数を数え、フィルター100cm²あたりの付着ウイルス数を求める。

同様の試験を、標準品（抗ウイルス処理のないフィルターが搭載された空気清浄機）で行い、ウイルス不活化効果を算出する。試験時間は 2 4 時間以内とする。

2) フィルターの試験片（3×3 cm以上）（9 枚）、標準品（抗ウイルス処理のないフィルタ）の試験片（3×3 cm以上）（9）枚を用意し、ファージ液またはインフルエンザウイルス液を接種する。フィルターの試験片（9）枚を試験品（空気清浄機）の対象フィルターの風上側に均等に配置したものと、標準品（抗ウイルス処理のないフィルタ）の試験片（9）枚を試験品（空気清浄機）の対象フィルターの風上側に均等に配置したものを用意する。

その後、それぞれの試験品（空気清浄機）を運転させ、一定時間後に試験片を回収する。詳細を以下に示す。

3) 試験系

20～32m³ の試験チャンバー内、または、セーフティキャビネット内に空気清浄機を設置する。

チャンバー内の温湿度条件は、初期温度は 23±10℃、初期湿度は（50±20）%RH とする。なお、試験中の温湿度がこの範囲を越える場合は、フィルターの試験片を用いた試験、標準品（抗ウイルス処理のないフィルタ）の試験片を用いた試験の両者を同条件に合わせる。

4) ファージ液またはインフルエンザウイルス液の調製

①ファージ液の調製（例）

ホストを普通寒天培地（例：日水製薬社製 Code.05514、または Nutrient Agar (NA) 培地（例：Difco）+0.5%NaCl で前培養した 1 コロニーを釣菌し、大腸菌用液体培地（例：NB 培地+0.5%NaCl）に植菌して、35±1℃で、18±2 時間静置培養する。または、35±1℃で 100rpm で 5±1 時間振とう培養する。

角型シャーレ下層培地（例：普通寒天培地、または NA 培地+0.5%NaCl を約 60mL）を作成し、培養した大腸菌液体培地 5mL（約 10⁸⁻⁹CFU/mL）（CFU：Colony forming unit）とファージ 5mL（約 10⁵⁻⁶PFU/mL）を、大腸菌とファージの比率がおよそ 1000：1 となるよう加えて混合し、35±1℃10～20 分間静置する。この液に、硬化しない程度に暖めた（例：45～50℃）軟 NB 寒天培地（NB 培地+0.5%NaCl+0.5%寒天）10mL を添加混合し、角型シャーレ下層培地へ重層し、固定化させて倒置せずに 35±1℃で 18±2 時間程度培養する。培養後、角型シャーレ上層をコンラージ棒を用いて、ストマッカー用袋（例：seward 社製#BA6141 standard bags）に回収し、260rpm で 2 分間ストマッキング後、35±1℃で 1 時間静置する。この液を別の 50mL 遠沈管に移し、3500rpm で 10 分間遠心し、上澄みをさらに別の 50mL 遠沈管に移す。

この遠心操作をさらに 2 回繰り返した後、上澄みを孔径 0.22μm のメンブレンフィルター（例：Stericup-MILLIPORE 社製 #SCGPU02RE）でろ過し、試験ファージ原液を得る。または、JIS T 8061 によるファージ液を調製する。

ファージ原液濃度は Phi-X174 の場合、10⁹～10¹⁰PFU/mL、MS2 の場合 10¹¹～10¹²PFU/mL 程度とし、作成したファージ原液は、試験に供すまで凍結保存、または、冷蔵保存する。噴霧試験直前に、解凍し、滅菌イオン交換水で希釈し、液の表面張力を 65～69（×10⁻³N/m）に調節し、ファージ液の濃度を 10⁶～10⁷PFU/mL に調製し、試験に供する。

なお、上記方法にて作成したファージ原液の使用期限は、凍結乾燥保存で、Phi-X174 は 3 ヶ月、MS2 は 6 ヶ月とし、噴霧ファージ液は、その日のうちに使い切る。

なお、試験で使用するファージは、凍結・解凍標品、または乾燥標品のアンプル(0代)を上記方法で培養した液(1代とする)を用い、作成すること(2代とする)。1代および2代を購入または輸送する場合は、冷凍輸送とし、輸送時に解凍されていないことを確認したもののみ使用可能とする。

②インフルエンザウイルス液の調製(例)

発育鶏卵の漿尿膜腔に、試験インフルエンザウイルスを接種する。ふ卵器で培養後、漿尿液を採取しショ糖密度勾配遠心法により精製したインフルエンザウイルス液をインフルエンザウイルス原液とする。作成したインフルエンザウイルス原液を滅菌イオン交換水もしくはリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)にて希釈し、インフルエンザウイルス濃度を $10^6 \sim 10^8$ PFU/mL (PFU: Plaque forming unit)もしくは $10^6 \sim 10^8$ TCID₅₀/mL (TCID₅₀: 50% tissue culture infectious dose)に調製し、試験に供する。

5) ファージ液またはインフルエンザウイルス液の試験片への接種

ファージ液またはインフルエンザウイルス液(50 μ l以上)をフィルターの試験片、標準品(抗ウイルス処理のないフィルター)の試験片に数箇所に分けて接種する。接種量は基準を1mlとし、フィルタの保水状態により50 μ lまで減らしてもよい。接種量を1mlから減らす場合、ウイルス液及びファージ液の濃度を、減らした接種量に応じて濃く調整してもよい。(例: フィルタへの接種量を0.1mlに減らす場合それぞれ、ファージ液の濃度 $10^7 \sim 10^9$ (PFU/ml)インフルエンザ液の濃度 $10^7 \sim 10^9$ (PFU/ml or TCID₅₀/ml)となる。この時、試験片を持ち上げ、ファージ液またはインフルエンザウイルス液が、自重で落ちない事とする。

なお、供試ウイルス液が試験片に浸透しにくい場合は、非イオン界面活性剤0.05%を添加しても良い。

6) ファージ液またはインフルエンザウイルス液の回収

回収した試験片は、それぞれに1枚あたり20ml以上のMEM(Minimum Essential Medium)、PBS(Phosphate buffered saline)、滅菌イオン交換水のいずれかを加え、①手振り(振幅30cm、30回振とう)②試験管用かくはん器(5秒、5回)、③ストマッカーで3分間処理、④ボルテックスミキサー(例: VORTEX GENIE2、Scientific Industries製)で、回転数3000rpm(攪拌レベル10)で3分間攪拌等でウイルスを試験片から洗い出す。洗い出した試料(液)は、フィルターの試験片(9)枚で1セット、標準品(抗ウイルス処理のないフィルタ)の試験片(9)枚で1セットとし、混合して測定に用いる。

フィルターに抗ウイルス効果のある物質を放射することで、効果を出す製品の場合、上記のフィルターの試験片を対象フィルターとし、試験品(空気清浄機)を運転させるときに、抗ウイルス効果のある物質を放射することで、評価を行う。

7) ファージ数またはインフルエンザウイルス感染価の測定

①ファージ数の測定(例)

誘出したファージ液を試料原液として、滅菌イオン交換水もしくはMEM、PBSで10倍段階希釈列を作製する。その試料原液または希釈液とファージ液調製時と同様の方法で大腸菌を培養した大腸菌液体培地を混合し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 10~20分間静置する。

この液に、 $45 \sim 50^\circ\text{C}$ の軟NB寒天培地を添加混合し、角型シャーレ下層培地へ重層し、固定化させて上下逆さにし $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で16~24時間程度培養する。培養後、培地上に発生したプラーク(例: 10~100/シャーレ)を数え、洗い出し液1ml当たり(または試験片1個当たり)のファージ数を求める。なお、洗い出し液はろ過滅菌をする。

②インフルエンザウイルス感染価の測定(例)

a) プラーク形成法を用いた場合

洗い出したファージウイルス液を試料原液として、イオン精製水もしくはMEM(Minimum Essential Medium)、PBSで10倍段階希釈列を作製する。その試料原液または希釈液をMDCK細胞に接種する。接種したMDCK細胞は、細胞培養液とAgaroseを等量混合したものを載せ、 37°C 、5%CO₂下で培養を行う。培養後固定染色を行い、発生したプラークを数え、洗い出し液1ml当たり(または試験片1個当たり)のイン

フルエンザウイルス感染価を求める。

b) TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) 法を用いた場合

洗い出したインフルエンザウイルス液を試料原液として、イオン交換水もしくは MEM、PBS で 10 倍段階希釈列を作製する。その試料原液または希釈液 100 μL と 5% ウシ胎児血清 (FBS : fetal bovine serum) を含む DMEM (Dulbecco' s modified Eagle' s Medium) に懸濁した MDCK 細胞 100 μL を 96 ウエルプレートに植え込む。その後、炭酸ガスふ卵器で培養後、顕微鏡下で細胞変性効果 (CPE : cytopathogenic effect) を確認し、Reed-Muench 法を用いて、洗い出し液 1ml 当たり (または試験片 1 個当たり) のインフルエンザウイルス感染価を求める。

6. 試験結果

試験の結果から、下記の式によりウイルス不活化効果を算出する。

$$R = \text{Log}(B/A)$$

R : ウイルス不活化効果

A : 標準品の一定時間後のファージ数またはインフルエンザウイルス感染価

B : フィルターの試験片の一定時間後のファージ数またはインフルエンザウイルス感染価

数値は、少数点以下 2 けた目を切り捨て、少数点以下 1 けたで表示する。

注 : 1 桁減少は 90% 減少、2 桁減少は 99% 減少である。計算式は以下のようになる。

$$\left[1 - \frac{1}{10^{(\text{桁減少})}} \right] \times 100(\%)$$

7. 抑制効果

本試験方法によって得られる対数減少値が 2.0 以上のとき、空気清浄機のフィルターに捕捉したウイルスに対する抑制効果があるものと判断する。

空気清浄機のフィルターに捕捉したウイルスに対する

抑制性能評価試験方法

解説

1. 目的

制定の趣旨

『空気清浄機のフィルターに捕捉したウイルスに対する抑制性能評価』については、国際規格、JIS 等の規格も無い状況から、各社にて、第三者試験機関の協力も交えつつ独自の試験方法により、その評価を行って来た。しかし、その試験方法等が各社で統一されていないためその効果が比較しにくく、またインフルエンザの流行により、空気清浄機のウイルスに対する除去または抑制性能が社会的に注目される様になった。そのため、その評価を業界で統一して行える様に、本抑制性能評価試験方法基準を定め、日本電機工業会 会員各社の評価／訴求の適正化を図る。

2. 対象品目

本基準を空気清浄機以外のその他の品目にも準用する事は妨げないが、対象とする品目の特性を考慮して、試験チャンバーの大きさ及び測定時間については、品目毎に設定する。

3. 試験機関

本基準はウイルスの除去や抑制を評価することから、『家庭電気製品製造業における表示に関する公正競争規約』に準拠し、公的機関とする。

4. 試験微生物

これまでウイルスに対する性能検証は、インフルエンザウイルスを指標ウイルスとして容積 1 m³ 等の密閉空間を用いて実施されてきたが、微生物的リスクの観点から、インフルエンザウイルスを広い空間に噴霧する性能検証方法は国内の評価機関で実施困難な状況である。社会的な関心の高まりもあることから、本来は対象とするウイルスを用いて性能評価を行なうべきではあるが、上記のような背景により、第三者機関での性能評価が実施困難であるため、本規定ではファージ MS2 と Phi-X174 をインフルエンザウイルスの代替ウイルスと位置づけ、試験微生物に加えている。

ファージは細菌に感染するウイルスの総称であり、人に対して感染せず、病原性を有しないウイルスである。ファージのなかには様々なタイプが存在するが、大腸菌に感染する MS2 と Phi-X174 は環境中において比較的安定であり、すでに JIS として制定されている試験法においても指標ウイルスとして用いられている。

ファージとインフルエンザウイルスの感受性について比較検証した結果、ファージの感受性は、インフルエンザウイルスに比べて同等以下であることが確認されている場合において、不活化効果においても過大評価されることはないと考えられる。

5. 試験方法

1) 試験系

試験空間および試験品設置は JEM1467(家庭用空気清浄機)の試験空間および試験品設置に合わせることをとする。設定するチャンパー内の温湿度条件は、使用するウイルスがその条件によって死滅するなどの影響を与えない条件とする。

コントロール環境（自然減衰等）での評価を行い、ウイルスの死滅がないことを確認すること。

試験品の運転時間について、フィルターに捕捉したウイルスの生存時間としては、24～48時間、湿潤環境では72時間以上とされ、JIS L 1902においても18時間の試験方法があることから、最大24時間と規定した。

3) 参考文献

- ファージがインフルエンザウイルスの代替となる根拠の資料
- ・ APIC guideline for selection and use disinfectant

以上__